

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

27 JAN 2005

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D	30 OCT 2003
WIPO	PCT

10/523077

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Gebrauchsmusteranmeldung**

Aktenzeichen: 202 13 551.9

Anmeldestag: 29. August 2002

Anmelder/Inhaber: INVITEK Gesellschaft für Biotechnik & Biodesign mbH,
Berlin/DE

Bezeichnung: ELISA-Kit zum Nachweis von Prokollagenase 3
in Körperflüssigkeiten und Zellkulturüberständen

IPC: C 07 K, C 12 N, C 12 P

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der
ursprünglichen Unterlagen dieser Gebrauchsmusteranmeldung.**

München, den 8. Oktober 2003
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident
Im Auftrag

Scholz

21/18 6.8.2002 10:46 *22/38* 2

ELISA-Kit zum Nachweis von Prokollagenase 3 in Körperflüssigkeiten und Zellkulturüberständen

5 Die Erfindung betrifft einen ELISA-Kit zum Nachweis von Prokollagenase 3 in Körperflüssigkeiten, insbesondere in Serum und Gelenkflüssigkeit des Menschen sowie in Zellkulturüberständen, und monoklonale Antikörper, die Prokollagenase 3 spezifisch erkennen.

Anwendungsbereiche sind die Medizin und hier besonders die medizinische Diagnostik.

10

Die *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)-Technik ist gegenwärtiger Technologiestandard in klinischen Labors. Mit dieser Technologie können u.a. Markerproteine für bestimmte Krankheiten in Körperflüssigkeiten von Patienten bestimmt werden.

15

Matrix Metalloproteininasen (MMPs) bilden eine Familie aus sezernierten und membrangebundenen Endoproteininasen, die extrazelluläre Matrixproteine hydrolyseren (Nagase, H. and Woessner, F. Jr., J. Biol. Chem. 1999, 274, 21491-21494). Auf der Grundlage ihrer bevorzugten Substrate und struktureller Merkmale kann man MMPs in Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine und Membran-Typ Metalloproteasen einteilen.

Kollagenase 3 (MMP-13) wird von Zellen als inaktives Zymogen, der Prokollagenase 3 (Pro-MMP-13), freigesetzt und extrazellulär durch die Abspaltung eines Propeptids aktiviert.

25

Sowohl Kollagenase 3 als auch Prokollagenase 3 sind typischerweise im ausdifferenzierten, adulten Gewebe nicht nachweisbar. Ihr Vorkommen ist jedoch im Zusammenhang mit einer ganzen Reihe von destruktiven Krankheitsbildern beschrieben: Bei der Ausbildung von Brustcarzinomen (Nielsen BS et al., Cancer Res.

30 2001 61:7091-7100), Rheumatoide Arthritis (Westhoff CS et al., Arthritis Rheum. 1999 42:1517-1527) und Osteoarrose (Shlopov BV et al. Arthritis Rheum. 1997 40:2065-2074) ist der Gehalt an Prokollagenase 3-mRNA in den betroffenen Gewebetypen stark hochreguliert. Diese Erkenntnisse machen deutlich, dass

3

Prokollagenase 3 ein für die medizinische Diagnostik hochinteressantes Markerprotein ist.

2

Bisher existieren jedoch für keinen Krankheitsverlauf, auch nicht für Rheumatoide Arthritis, Untersuchungen zum tatsächlichen Gehalt von Prokollagenase 3 in Körperflüssigkeiten, wie Serum oder Gelenkflüssigkeit, da bis dato keine zufriedenstellende technologische Lösung auf dem Markt verfügbar war, die solche Messungen erlaubt hätte.

10 Zur Zeit werden zwei Produkte angeboten, mit denen prinzipiell der Gehalt an Prokollagenase 3 bestimmt werden kann.

15 1. Biotrak® Matrix Metalloproteinase-13 ELISA system
Der erste Test, das *Biotrak Matrix Metalloproteinase-13 ELISA system*, ist für die Körperflüssigkeiten Serum und Plasma validiert. Das Problem des Testes ist die sehr geringe Sensitivität. Außerdem ist der Test nicht für Untersuchungen von Gelenkflüssigkeit validiert und kann somit für diesen Zweck nicht verwendet werden.

20 2. Quantikine® pro-MMP-13 Immunoassay
Das zweite Testsystem auf dem Markt ist ausschließlich für den Gebrauch in der Zellkultur bestimmt und kann somit nicht für Untersuchungen von Prokollagenase 3 in Körperflüssigkeiten eingesetzt werden.

25 Der Erfindung lag demzufolge die Aufgabe zugrunde, einen ELISA-Kit zur Verfügung zu stellen, der sich im Gegensatz zu den auf dem Markt befindlichen Tests durch eine hohe Sensitivität auszeichnet und sowohl für den Nachweis der Prokollagenase 3 in Körperflüssigkeiten, insbesondere in Serum und Gelenkflüssigkeit des Menschen, als auch in Zellkulturüberständen geeignet ist.

30 Die Erfindung wird gemäß den Ansprüchen realisiert.

Der erfindungsgemäße ELISA-Kit zum Nachweis von Prokollagenase 3 umfaßt in separater Verpackung wenigstens:

- a) einen festen Träger mit daran gebundenen monoklonalen Antikörpern, die sensitiv und spezifisch humane Prokollagenase 3 binden;
- b) humane rekombinante Prokollagenase 3 als Standard zur quantitativen Bestimmung dieses Enzyms in Körperflüssigkeiten und Zellkulturerständen;
- c) einen Puffer zum Herstellen einer Standardreihe der rekombinanten Prokollagenase 3;
- d) einen Puffer zum Verdünnen der zu untersuchenden Proben;
- e) ein detektierbar markiertes Konjugat, das an Prokollagenase 3 bindet; und
- f) ein Substrat, das die Sichtbarmachung des detektierbar markierten Konjugats erlaubt,

wobei es sich bei den unter a) genannten monoklonalen Antikörpern vorzugsweise um Anti-MMP-13 Klon M34 (mouse) handelt, und besonders bevorzugt um monoklonale Antikörper, die von dem Hybridom mit der Hinterlegungsnummer **DSM ...** gebildet werden.

Als detektierbar markiertes Konjugat wird entweder eine Kombination von zwei Komponenten eingesetzt, wobei es sich bei der ersten Komponente um biotinylierte Antikörper handelt, die an Prokollagenase 3 binden; und als zweite Komponente um ein hochpolymeres Streptavidin-Konjugat, das an die biotinylierten Antikörper bindet.

Alternativ dazu können auch konjugierte Antikörper eingesetzt werden, die an Prokollagenase 3 binden.

Die Antikörper, die als Konjugat fungieren, können monoklonale und/oder polyklonale Antikörper sein.

Humane rekombinante Prokollagenase 3, die in eukaryontischen Zellen (SF9-Zellen) exprimiert wurde, wird als Standard zur quantitativen Bestimmung der Prokollagenase 3 in Körperflüssigkeiten und Zellkulturerständen eingesetzt. Sie liegt entweder in Lösung oder in gefriergetrockneter Form vor, in der sie mehrere Monate ohne Qualitätsverlust haltbar ist. Bei Vorliegen in gefriergetrockneter Form muß die rekombinante Prokollagenase 3 vor Benutzung zunächst durch Zugabe von destilliertem Wasser rekonstituiert werden.

Der für die Verdünnung von zu untersuchenden Proben vorgesehene Puffer enthält neben blockierenden und stabilisierenden Substanzen unter anderem Natriumcitrat. Es zeigte sich überraschenderweise, dass dieses Reagenz für die Vorbereitung von Serum des Menschen 5 zur Messung von Prokollagenase 3 besonders gut geeignet ist.

Der Puffer zum Herstellen einer Standardreihe der rekombinanten Prokollagenase 3 zur Messung dieses Markers in Serum enthält humanes Serum.

10 Als feste Träger werden vorzugsweise Mikrotiterplatten verwendet, an die der erfindungsgemäße monoklonale Antikörper gebunden ist. Diese Mikrotiterplatten werden so produziert, dass sie mehrere Monate ohne Qualitätsverlust gelagert werden können.

15 Gegenstand der Erfindung sind auch monoklonale Antikörper, die Prokollagenase 3 spezifisch erkennen und binden, wobei diese monoklonalen Antikörper von der Hybridomzelllinie mit der Hinterlegungsnummer **DSM ...** produziert werden bzw. Eigenschaften wie die monoklonalen Antikörper aus der Hybridomzelllinie mit der Hinterlegungsnummer **DSM ...** aufweisen.

20 Zur Erfindung gehören ebenso Antikörper, die Eigenschaften wie die monoklonalen Antikörper aus der Hybridomzelllinie mit der Hinterlegungsnummer **DSM ...** aufweisen, die jedoch biochemisch oder molekularbiologisch verändert oder synthetisch sein können, wobei dem Antikörper ggf. Teile, die für die Erkennung der Prokollagenase 3 nicht 25 notwendig sind, ganz oder teilweise fehlen bzw. diese Teile durch andere ersetzt sind.

Die Hybridomzelllinie mit der Hinterlegungsnummer **DSM ...** ist ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

30 Durch den erfindungsgemäßen ELISA-Kit wird der Nachweis von Prokollagenase 3 in Körperflüssigkeiten, insbesondere in Serum und Gelenkflüssigkeit des Menschen, sowie in Zellkulturüberständen mit hoher Sensitivität ermöglicht und damit dieser potentielle Krankheitsmarker der medizinischen Diagnostik besser zugänglich gemacht.

6

Im Vergleich zu dem *Biotrak® Matrix Metalloproteinase-13 ELISA system* ist die Sensitivität des erfindungsgemäßen ELISA-Kits um den Faktor fünf höher. Bei Untersuchungen von humanem Serum mit dem erfindungsgemäßen ELISA-Kit lässt sich die Sensitivität sogar auf mehr als zehnfach steigern. In Zahlen ausgedrückt, liegt die 5 untere Nachweisgrenze des ELISAs bei 6 pg Prokollagenase 3 / ml Probe.

Die bei der Messung ermittelte Standardkurve durch Untersuchung einer mitgeführten humanen rekombinanten Prokollagenase 3 ist über den gesamten Messbereich linear und erlaubt eine schnelle Berechnung des Kollagenasegehaltes in Proben mit Hilfe der 10 dem Standardverlauf zugrunde liegenden Regressionsgeraden. Ein weiterer entscheidender Vorteil ist, dass der ELISA-Kit im Kühlschrank gelagert werden kann, was die Handhabbarkeit und Verbraucherfreundlichkeit wesentlich verbessert.

Der erfindungsgemäße ELISA-Kit zum Nachweis von Prokollagenase 3 weist 15 insgesamt für den Endverbraucher eine mindestens einmonatige Haltbarkeit auf. Die Produktion erfolgt nach Standards der EN 46001 und EN ISO 9001. Der ELISA-Kit bietet erstmals die Möglichkeit zur Untersuchung von Gelenkflüssigkeit.

Die Erfindung soll nachstehend durch Beispiele und Abbildungen näher erläutert 20 werden.

Beispiel 1: Herstellung und Screening der monoklonalen Antikörper

Zur Immunisierung wurden Mäuse verwendet. Als Antigen diente humane 25 rekombinante Prokollagenase 3, die in Sf9-Zellen exprimiert wurde. Das Antigen wurde folgendermaßen vorbereitet: 50 µg MMP-13 in 100 µl PBS + 100 µl 6M Harnstoff wurden vorgelegt. Zu dieser Lösung wurden 100 µl CFA oder IFA gegeben.

Die Injektion wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

Tag 0: 50 µg MMP-13 intraperitoneal in CFA

30 Tag 13: 50 µg intraperitoneal in IFA

Tag 41: 50 µg intravenös in 1 ml PBS

Tag 44: Hybridisierung von Pre-Lymphozyten mit Milz- und SP 2/0 Myelomzellen.

Es wurden drei Hybridisierungen aus ein und derselben Milz mit verschiedenen Lymphozytenmengen durchgeführt. Die dritte Hybridisierung war erfolgreich.

Überstände der ausgewachsenen Hybridome wurden im ELISA getestet. Dazu wurden 100 µl rekombinante humane Prokollagenase 3 (1 µg/ml in PBS) in den Näpfen einer 5 Titerplatte über Nacht bei 4 °C immobilisiert und nach 3 Wasch-Schritten (PBS mit 0,05 % Tween® 20) mit einem Blockierungspuffer (1 % BSA in PBS) zwei Stunden blockiert. Jeweils 50 µl der Zellkulturerstande sowie Positiv- und Negativkontrollen wurden für eine Stunde (37 °C) in die Näpfe gegeben. Nach dieser Inkubation wurde die Platte dreimal gewaschen und für eine weitere Stunde (37 °C) 100 µl Anti-Maus 10 IgG(H+L)-POD-Konjugat zugegeben. Nach weiteren fünf Waschungen wurde der POD-Gehalt in den Näpfen mit je 100 µl TMB Substrat (20 min, RT) detektiert. Die Reaktion wurde mit 50 µl 2 M H₂SO₄ gestoppt und die Absorption bei 450 nm gemessen.

Die im ELISA positiven Hybridomüberstände wurden bis zur Monoklonalität kloniert 15 und rekloniert. Es wurden 5 unabhängige monoklonale Antikörper erhalten, aus denen insgesamt 12 Subklone mit teilweise veränderten Affinitäten gewonnen wurden. Eine Hybridomzelllinie, die die erfundungsgemäßen monoklonalen Antikörper Anti-MMP-13 Klon M34 (mouse) produziert (IgG1), wurde bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig unter der Nummer 20 DSM ... am xxx hinterlegt.

Beispiel 2: Durchführung des ELISAs

Das Prinzip des ELISAs ist in Abbildung 1 dargestellt. Zur Durchführung des ELISAs 25 wird aus der humanen rekombinanten Prokollagenase 3 eine Verdünnungsreihe als Standard erstellt, die die rekombinante Prokollagenase 3 in folgenden Konzentrationen enthält: 2000 pg/ml, 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,25 pg/ml, 0 pg/ml. Wenn der Prokollagenase 3 Gehalt in Serum bestimmt werden soll, wird die Standardverdünnung mit einem speziellen Puffersystem hergestellt, das 33 % 30 humanes Serum enthält. Jeweils 100 µl dieser Standardverdünnungen werden in Doppelbestimmung in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte, an die monoklonale Antikörper aus der Hybridomzelllinie mit der Hinterlegungsnummer DSM ... gebunden sind, pipettiert. Die zu messenden Proben (Zellkulturmedium, Gelenkflüssigkeit oder

Serum) werden mit dem für die Probenvorbereitung vorgesehenen Puffer verdünnt. Von den verdünnten Proben werden dann ebenfalls jeweils 100 µl in Doppelbestimmung aufgetragen.

Nach 90 Minuten Inkubation auf einem Schüttler bei Raumtemperatur wird die 5 Mikrotiterplatte mit dem Waschpuffer vier Mal gewaschen und danach durch Ausschlagen auf Papierhandtüchern die verbliebene Flüssigkeit entfernt. Es folgt der Eintrag von jeweils 100 µl Detektionslösung 1, die biotinylierte Antikörper enthält, in alle benutzten Wells der Mikrotiterplatte. Hierbei handelt es sich entweder um polyklonale Antikörper oder aber um einen monoklonalen Antikörper oder einen 10 Cocktail aus mehreren monoklonalen Antikörpern. Nach weiteren 90 Minuten Inkubation wird die Mikrotiterplatte wiederum vier Mal gewaschen und auf einem Papiertuch ausgeschlagen. Die Detektionslösung 2, bestehend aus einem Streptavidin-Peroxidasekonjugat und einem Verdünnungspuffer, wird gemäß Anweisung hergestellt und wiederum jeweils 100 µl in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterplatte 15 pipettiert. Es folgt eine weitere Inkubation von 30 Minuten. Danach wird die Mikrotiterplatte sechs Mal gewaschen und ausgeschlagen, mit 100 µl pro Vertiefung Substratlösung (Tetramethylbenzidin) versehen und im Dunkeln für 15 Minuten inkubiert. Nach Ablauf der Zeit werden 100 µl Stopplösung (0,5 M Schwefelsäure) den 20 Vertiefungen zugesetzt und die Mikrotiterplatte bei 450 nm in einem Mikrotiterplattenreader gemessen. Die Intensität der optischen Dichte entspricht dem Gehalt an Prokollagenase 3.

Beispiel 3: Untersuchung von Körperflüssigkeiten mit dem ELISA-Kit

25 In Abbildung 2 werden die Ergebnisse der Untersuchung von Serum (2A) und Gelenkflüssigkeit (2B) von Patienten mit diagnostizierter Osteoarrose dargestellt. Der ELISA-Kit detektiert unterschiedliche Konzentrationen in diesen Proben. Es zeigt sich, dass etwa 20 % der Serumproben und 40 % der Gelenkflüssigkeitsproben Prokollagenase 3 positiv sind. In Abbildung 3 sind Messergebnisse in Patientenserien 30 mit diagnostizierter rheumatischer Erkrankung dargestellt. Auch hier detektiert der ELISA-Kit in etwa 20 % der Fälle einen erhöhten Prokollagenase 3 Gehalt in den Proben.

Beim direkten Vergleich zwischen dem erfindungsgemäßen ELISA-Kit und dem *Biotrak® Matrix Metalloproteinase-13 ELISA system* zeigt sich, dass nur der

beanspruchte ELISA-Kit in den untersuchten Proben in der Lage ist, Prokollagenase 3 zu detektieren (Abbildung 4).

g

Legende zu den Abbildungen**Abbildung 1:****5 Prinzip des Nachweisverfahrens**

Schritt 1: Inkubation von Standards oder Proben auf der Titerplatte. Spezifische Bindung von Prokollagenase 3 (MMP-13) (Dauer: 90 Minuten)

10 Schritt 2: Detektion der gebundenen Prokollagenase 3 (MMP-13) mit biotinyliertem Antikörper (Dauer: 90 Minuten)

Schritt 3: Zugabe von Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (Dauer: 30 Minuten)

15 Schritt 4: Farbentwicklung nach Zugabe von TMB-Substrat (Dauer: 15 Minuten)

Abbildung 2A:

Messung des Gehaltes an MMP-13 im Serum von Patienten mit diagnostizierter
20 Osteoarrose

Abbildung 2B:

Messung des Gehaltes an MMP-13 in der Gelenkflüssigkeit von Patienten mit
25 diagnostizierter Osteoarrose.

Abbildung 3:

Messung des Gehaltes an MMP-13 im Serum von Patienten mit diagnostizierter
30 rheumatischer Erkrankung. 18 % der Patienten sind im Test eindeutig positiv.

Abbildung 4:

10

Messung des Gehaltes an MMP-13 im Serum von Patienten mit diagnostizierten rheumatischen Erkrankungen. Die Messung der gleichen Proben wurden mit dem Biotrak® Matrix Metalloproteinase-13 ELISA system bzw. dem beanspruchten ELISA (InviLISA) durchgeführt. Das Produkt des Wettbewerbs ist nicht in der Lage, MMP-13 in der Konzentration bis zu 500 pg/ml in humanem Serum nachzuweisen.

R

Schützansprüche

1. ELISA-Kit zum Nachweis von Prokollagenase 3 in Körperflüssigkeiten, insbesondere in Serum und Gelenkflüssigkeit des Menschen, sowie in Zellkulturüberständen, umfassend in separater Verpackung wenigstens:

- 5 g) einen festen Träger mit daran gebundenen monoklonalen Antikörpern, die sensitiv und spezifisch humane Prokollagenase 3 binden;
- 10 h) humane rekombinante Prokollagenase 3 als Standard zur quantitativen Bestimmung dieses Enzyms in Körperflüssigkeiten;
- 15 i) einen Puffer zum Herstellen einer Standardreihe der rekombinanten Prokollagenase 3;
- j) einen Puffer zum Verdünnen der zu untersuchenden Probe;
- k) ein detektierbar markiertes Konjugat, das an Prokollagenase 3 bindet;
- l) und ein Substrat, das die Sichtbarmachung des detektierbar markierten Konjugats erlaubt.

2. ELISA-Kit nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass

20 es sich bei den monoklonalen Antikörpern, die an den festen Träger gebunden sind, vorzugsweise um monoklonale Antikörper handelt, die von dem Hybridom mit der Hinterlegungsnummer **DSM ...** gebildet werden.

3. ELISA-Kit nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass

25 als detektierbar markiertes Konjugat eine Kombination von zwei Komponenten eingesetzt wird, wobei es sich bei der ersten Komponente um einen biotinylierten Antikörper handelt, der an Prokollagenase 3 bindet; und als zweite Komponente ein hochpolymeres Streptavidin-Konjugat eingesetzt wird, das an die biotinylierten Antikörper bindet.

30 4. ELISA-Kit nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass

als detektierbar markiertes Konjugat ein konjugierter Antikörper eingesetzt wird, der an Prokollagenase 3 bindet.

5. ELISA-Kit nach Anspruch 1, 2 und 4, dadurch gekennzeichnet, dass

B

die Antikörper, die als Konjugat fungieren, monoklonale und/oder polyklonale Antikörper sind.

6. ELISA-Kit nach Anspruch 1-5, dadurch gekennzeichnet, dass

5 die als Konjugate eingesetzten Substanzen mit allen üblichen Substanzen konjugiert werden können, vorzugsweise mit:

- Meerrettichperoxidase
- alkalischer Phosphatase.

10 7. ELISA-Kit nach Anspruch 1-6, dadurch gekennzeichnet, dass

die als Standard eingesetzte humane rekombinante Prokollagenase 3 in eukaryontischen Zellen exprimiert wurde und in Lösung oder lyophilisiert vorliegt.

15 8. ELISA-Kit nach Anspruch 1-7, dadurch gekennzeichnet, dass

der Puffer zum Verdünnen der zu untersuchenden Körperflüssigkeiten und Zellkulturerstände Natriumcitrat enthält.

9. ELISA-Kit nach Anspruch 1-8, dadurch gekennzeichnet, dass

20 als feste Träger vorwiegend Mikrotiterplatten eingesetzt werden.

10. Monoklonale Antikörper, die Prokollagenase 3 spezifisch erkennen und binden, wobei diese monoklonalen Antikörper Eigenschaften wie die monoklonalen Antikörper aus der Hybridomzelllinie mit der Hinterlegungsnummer **DSM ...** aufweisen.

25

11. Monoklonale Antikörper nach Anspruch 10, wobei die monoklonalen Antikörper biochemisch oder molekularbiologisch verändert oder synthetisch sein können, wobei den Antikörpern ggf. Teile, die für die Erkennung der Prokollagenase 3 nicht notwendig sind, ganz oder teilweise fehlen bzw. diese Teile durch andere ersetzt sind.

30

12. Monoklonale Antikörper nach Anspruch 10-11, die von der Hybridomzelllinie mit der Hinterlegungsnummer **DSM ...** produziert werden.

13

14

13. Hybridomzelllinie mit der Hinterlegungsnummer **DSM ...**

Abbildung 1:

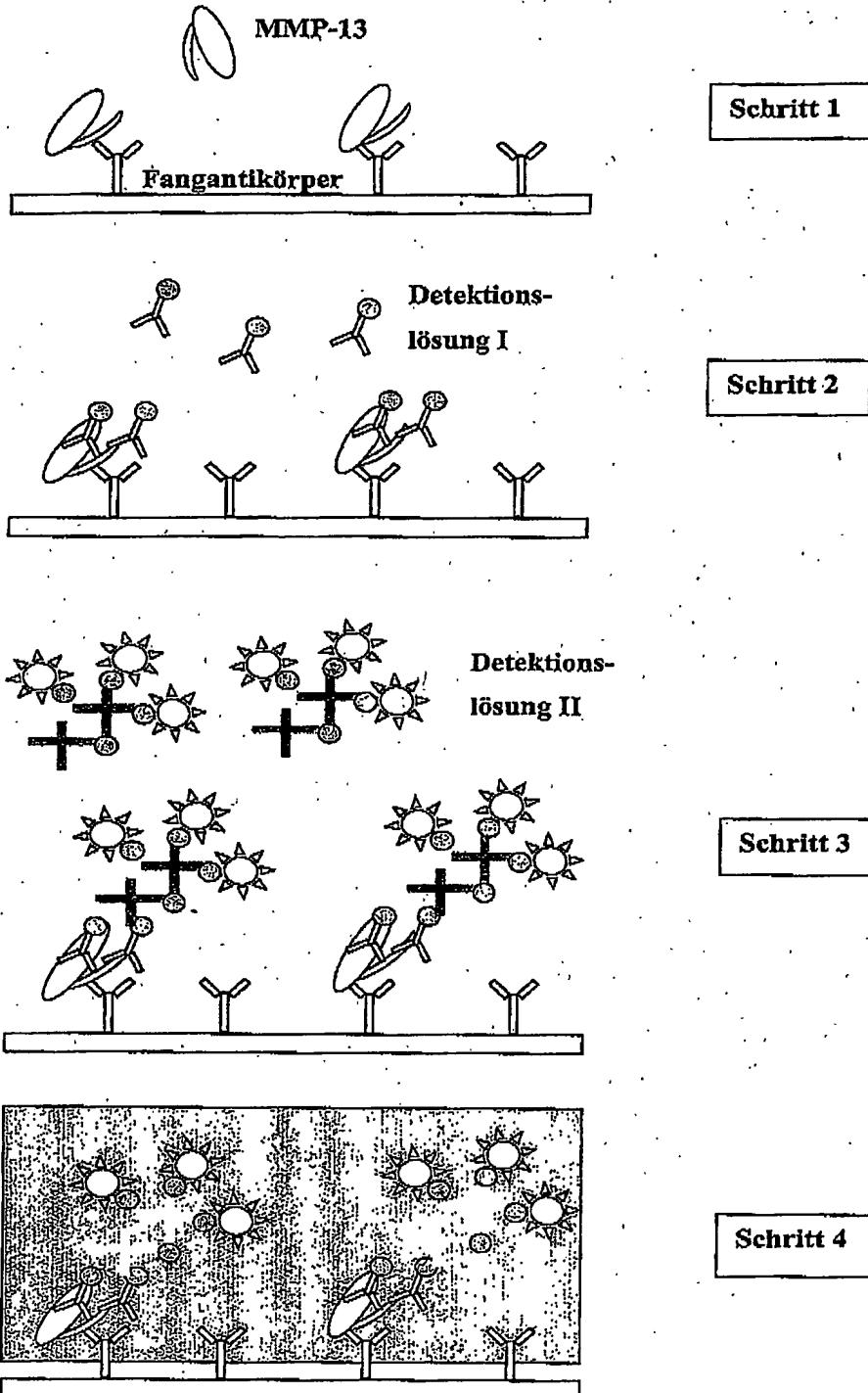
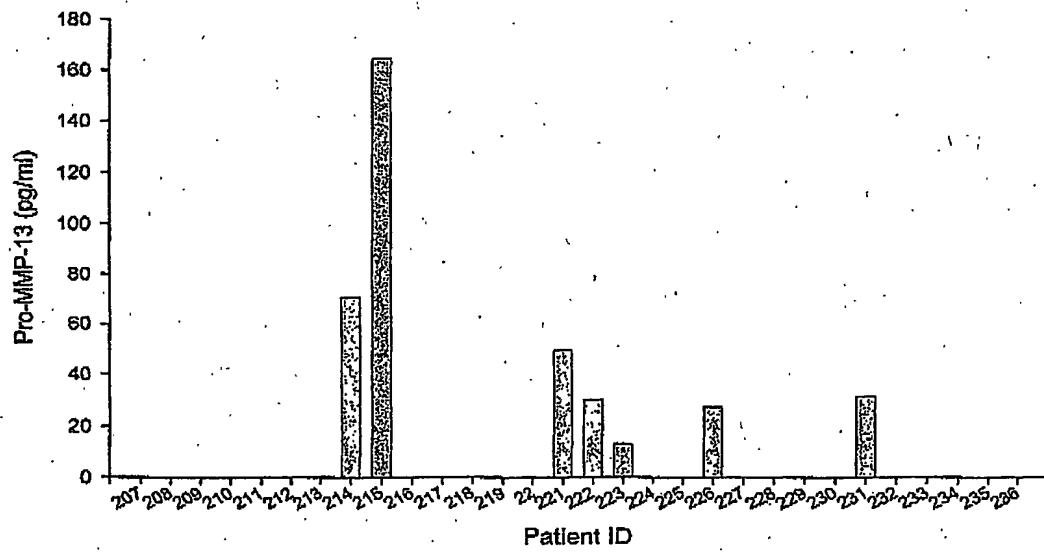
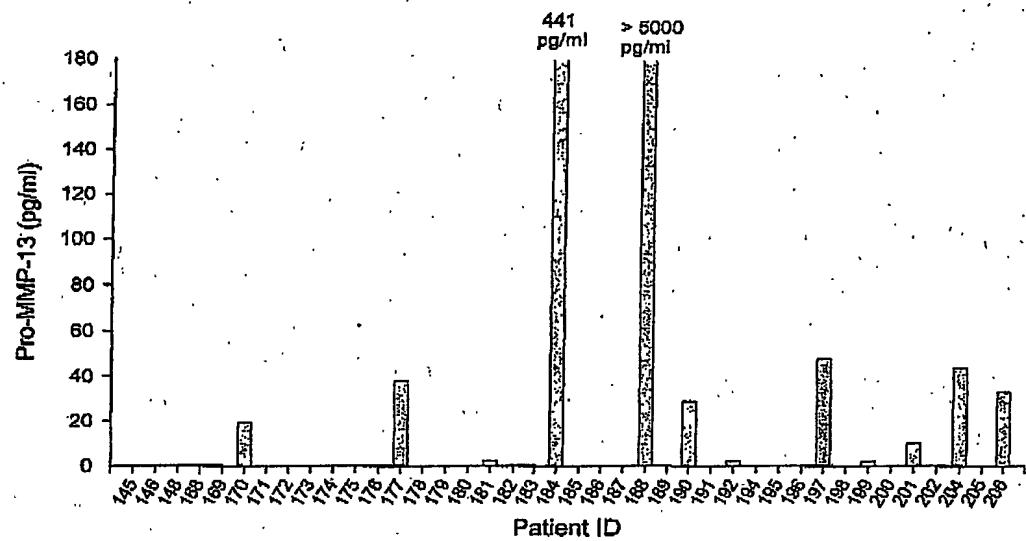


Abbildung 2A:

71 Patienten mit diagnostizierter Osteoarthrose
(Z.n. Knie- oder Hüftgelenks-OP)

(eindeutig Positive: 23%)



17

Abbildung 2B:

Gelenkflüssigkeit von Patienten mit diagnostizierter Osteoarrose
(Z.n. Knie- oder Hüftgelenks-OP)

(eindeutig Positive: 43 %)

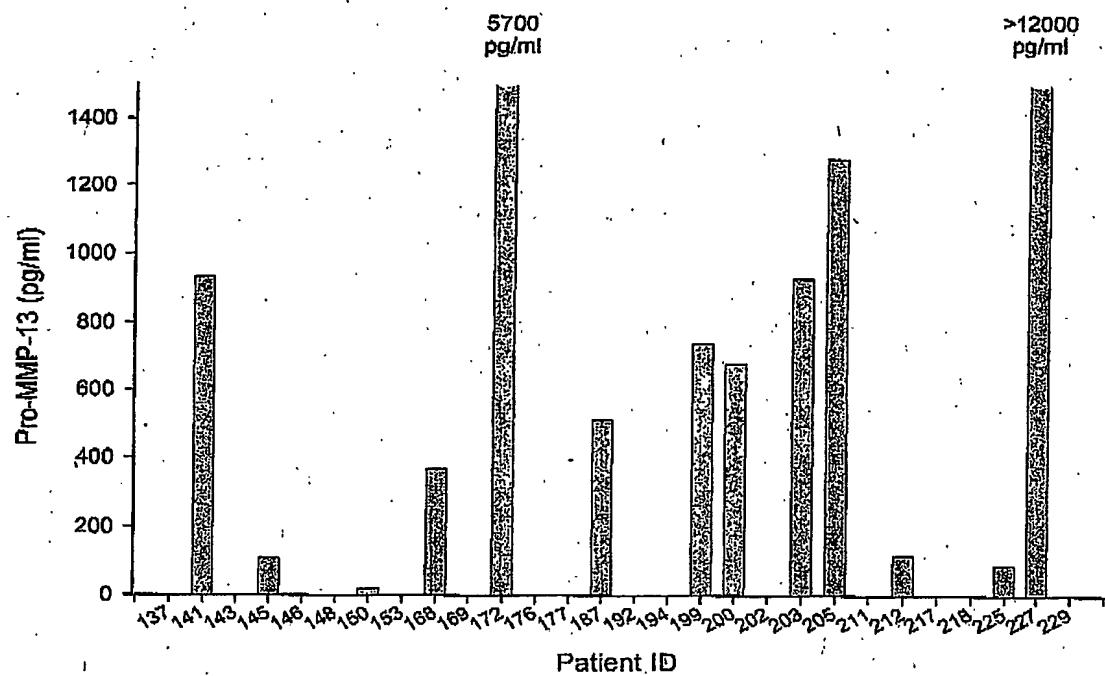
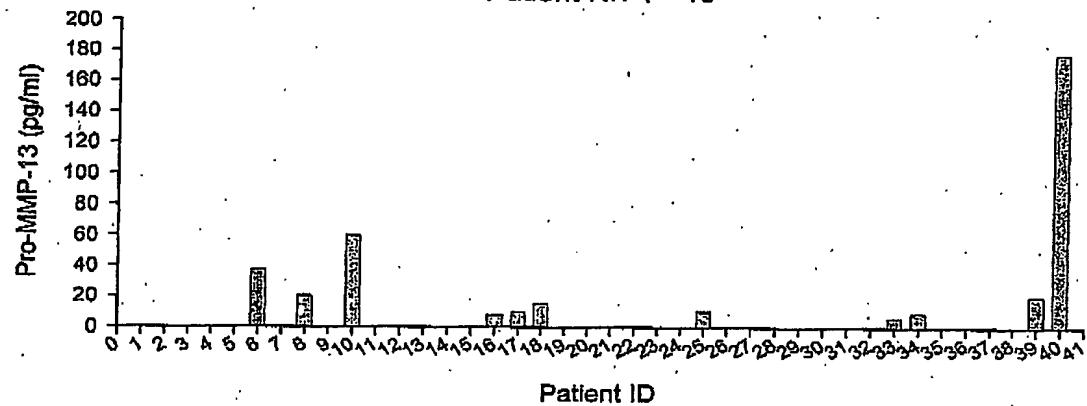
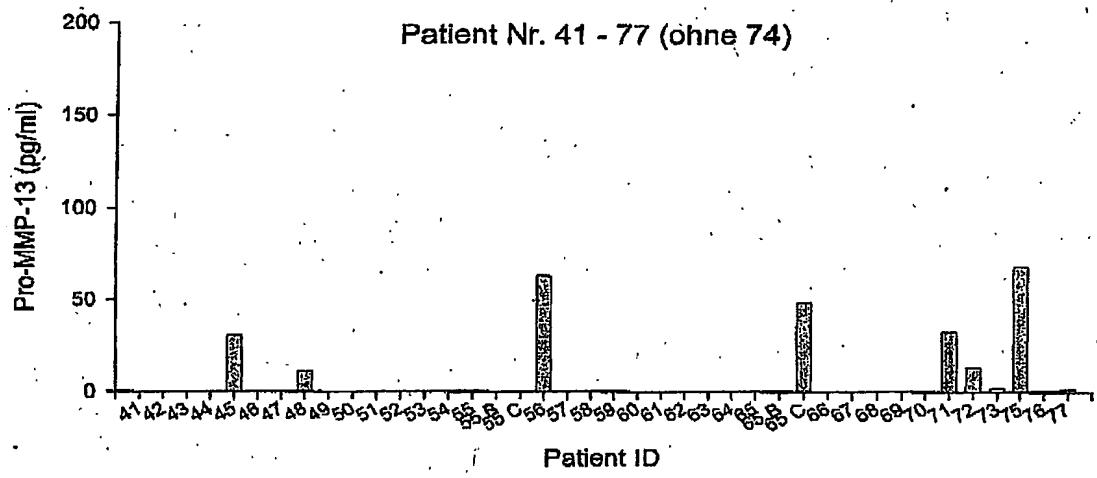


Abbildung 3:

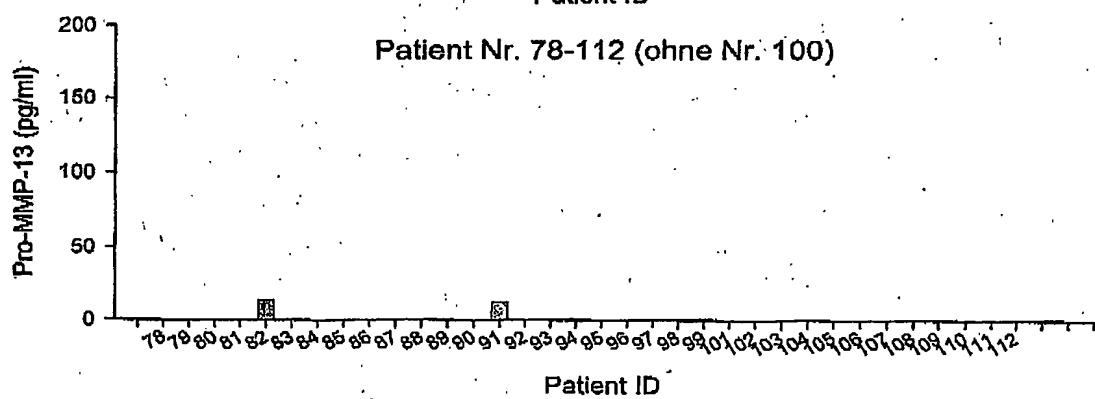
Patient Nr. 1 - 40



Patient Nr. 41 - 77 (ohne 74)

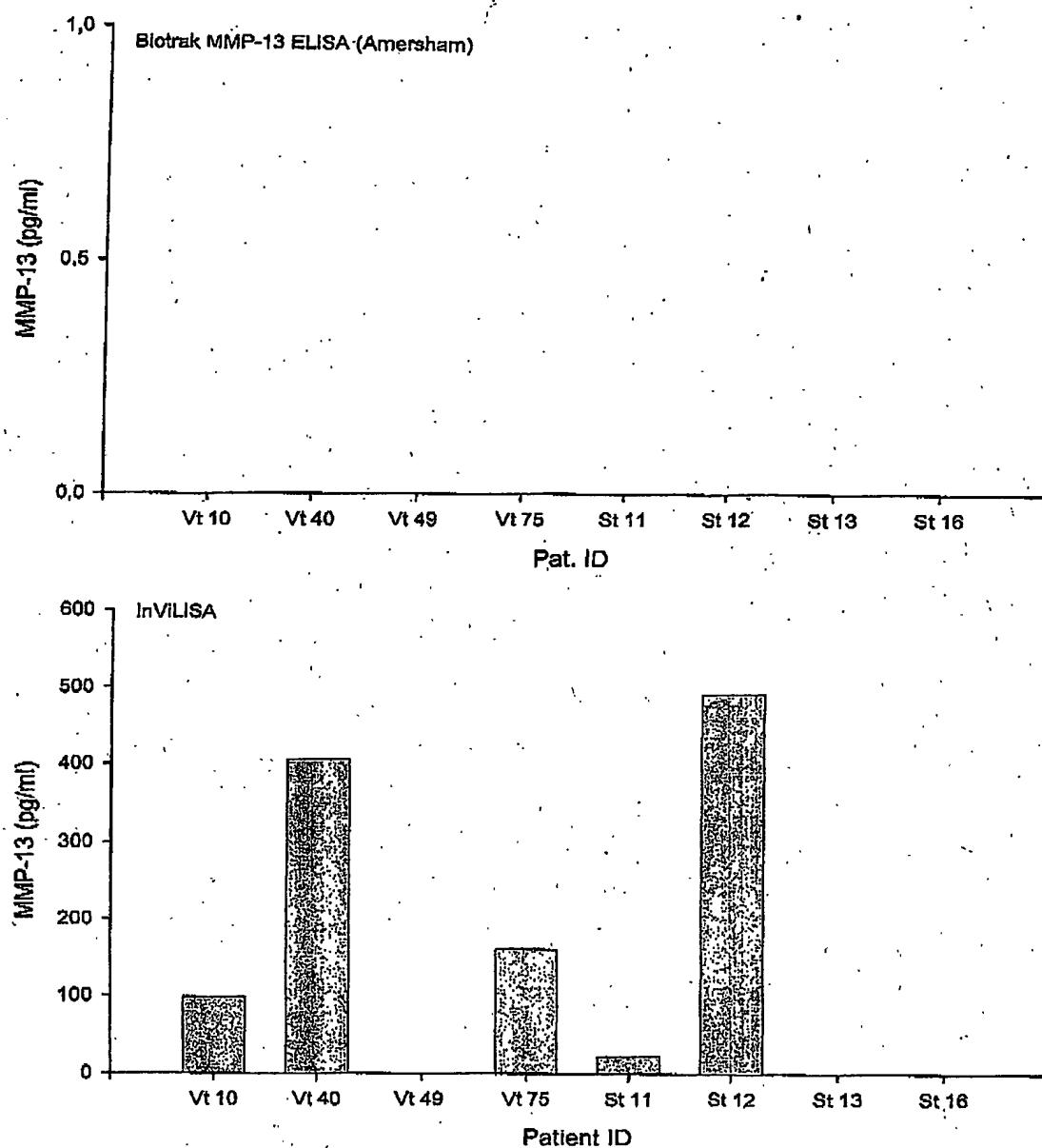


Patient Nr. 78-112 (ohne Nr. 100)



BG

Abbildung 4:



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.